【19】中華民國 【12】專利公報 （B）

【11】證書號數：I634899

【45】公告日： 中華民國 107 (2018) 年 09 月 11 日

【51】Int. Cl.： *A61K39/29 (2006.01)* *A61K39/39 (2006.01)*
C07K14/02 (2006.01) *C12N15/34 (2006.01)*

發明 全 18 頁

【54】名 稱：包含類Ｂ肝病毒顆粒作為佐劑的疫苗組成物
VACCINE COMPOSITION COMPRISING HEPATITIS B VIRUS-LIKE PARTICLE AS ADJUVANT

【21】申請案號：106140290 【22】申請日： 中華民國 106 (2017) 年 11 月 21 日

【11】公開編號：201818962 【43】公開日期： 中華民國 107 (2018) 年 06 月 01 日

【30】優 先 權： 2016/11/22 美國 62/425,079

【72】發 明 人： 黃立民 (TW) HUANG, LI MIN；黃任民 (TW) HUANG, JEN MIN

【71】申 請 人： 國立臺灣大學 NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY
臺北市羅斯福路 4 段 1 號

【74】代 理 人： 潘柏均；鄭人文

【56】參考文獻：

CN 1191853C CN 101948510B

WO 2015124919A1

NCBI GenBank: CAA01272.1 RSV F [online] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA01272.1 1994/10/03

審查人員：劉建宏

【57】申請專利範圍

1. 一種疫苗組成物，包含抗原和佐劑，其中，該佐劑是類 B 肝核心病毒顆粒(HBc VLP)，該顆粒具有與 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列具有至少 80%一致的胺基酸序列且具有與 SEQ ID NO：1 相同的功能，以及其中，該抗原源自呼吸道融合病毒(RSV)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其中，該佐劑是由 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列所組成的 HBc VLP。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其中，該抗原是由 SEQ ID NO：2 至 SEQ ID NO：4 中之一表示的重組 RSV F 蛋白。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其中，該佐劑以 0.1μg 至 1,000μg 的佐劑有效量存在。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其中，該抗原和佐劑的重量比為 10：1 至 1：10。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述的疫苗組成物，其中，該抗原和佐劑的重量比為 5：1 至 1：5。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其適用於黏膜疫苗接種。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其適用於口服、鼻腔、直腸或陰道使用。
9. 如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物，其誘導黏膜免疫反應和系統性免疫反應，該黏膜免疫反應是抗原特異性分泌性 IgA 抗體的產生，而該系統性免疫反應是抗原特異性 IgG 抗體的產生和抗原特異性細胞介導性免疫的產生。

10. 一種如申請專利範圍第 1 項所述的疫苗組成物於製備疫苗的用途，包含給藥該疫苗至受試者的黏膜表面。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述的用途，其中，該黏膜表面選自呼吸道黏膜、胃腸黏膜、陰道黏膜、鼻黏膜、直腸黏膜和口腔黏膜所組成的群組。

12. 如申請專利範圍第 10 項所述的用途，其中，該受試者是人或動物。

圖式簡單說明

通過閱讀下述具體實施例的詳細說明並參照附圖，可更完整地理解本揭露，其中：

第 1A 至 1I 圖是 HRØ24、HRØ、HRØ-3Ø 重組蛋白和 HBc 的 SDS-PAGE 分析結果。第 1A、1C、1E、和 1G 圖分別顯示對經純化的 HRØ24、HRØ、HRØ-3Ø 重組蛋白以及 HBc 的考馬斯亮藍染色；第 1B、1D、和 1F 圖分別顯示使用抗 His 抗體對經純化的 HRØ24、HRØ、和 HRØ-3Ø 重組蛋白的西方墨點轉漬；第 1H 圖顯示使用兔多株抗 HBc 抗體對經純化的 HBc 的西方墨點轉漬；以及，第 1I 圖顯示使用鼠單株抗 RSV 抗體對經純化的 HBc 和 HRØ24 重組蛋白的西方墨點轉漬。

第 2 圖顯示經純化的 HBc 的 TEM 圖像。

第 3A 和 3B 圖顯示鼻內(IN)免疫接種程序表。第 3A 圖顯示，使用候選疫苗在第 0、3、6、和 9 周對各組小鼠免疫接種 4 次，並令小鼠在第 12 周接受 RSV 激發；而第 3B 圖顯示，使用候選疫苗在第 0、3、和 6 周對各組小鼠免疫接種 3 次，並令小鼠在第 9 周接受 RSV 激發。另包括一組為在 RSV 激發前使用經福馬林固定的 RSV(FIRSV)進行肌肉內(i.m)免疫接種。在 RSV 激發前 2 天，從使用相同投藥方案的各組別收集小鼠血清、BALF 和脾臟。

第 4A 至 4F 圖顯示接受 4 劑與 HBc VLP 混合或不混合的 HRØ24 的鼻內給藥的小鼠體內的 HRØ24 和 FIRSV 特異性抗體反應。在進行 RSV 激發前 2 天，從各組收集小鼠血清。第 4A 至 4C 圖分別顯示從血清測量的 HRØ24 特異性總 IgG、IgG1、和 IgG2a 反應；以及，第 4D 至 4F 圖分別顯示從血清測量的 FIRSV 特異性總 IgG、IgG1、和 IgG2a 反應。

第 5A 至 5K 圖顯示接受 4 劑與 CpG 混合或不混合的 HRØ24 與 HBc VLP 混合物的鼻內給藥的小鼠體內的 HRØ24 和 FIRSV 特異性抗體反應和脾細胞再刺激。在進行 RSV 激發前 2 天，收集小鼠血清、BALF、和脾臟。第 5A 至 5D 圖分別顯示從血清測量的 HRØ24 特異性總 IgG、IgG1、IgG2a 反應和 IgG2a/IgG1 比；第 5E 至 5H 圖分別顯示從血清測量的 FIRSV 特異性總 IgG、IgG1、IgG2a 反應和 IgG2a/IgG1 比；第 5I 和 5J 圖分別顯示從 BALF 檢測的 HRØ24 和 FIRSV 特異性分泌性 IgA(sIgA)反應；以及，第 5K 圖顯示在抗原再刺激實驗中檢測的 IFN-γ 的水平。

第 6A 至 6H 圖顯示接受 4 劑與 CpG 混合或不混合的 HRØ24 與 HBc VLP 混合物的鼻內給藥的小鼠體內的 RSV F 蛋白位點Ø和位點 II 特異性抗體反應。在進行 RSV 前 2 天，收集各組的小鼠血清。第 6A 至 6D 圖分別顯示從血清測量的位點Ø特異性總 IgG、IgG1、IgG2a 反應和 IgG2a/IgG1 比；以及，第 6E 至 6H 圖分別顯示從血清測量的位點 II 特異性總 IgG、IgG1、IgG2a 反應和 IgG2a/IgG1 比。

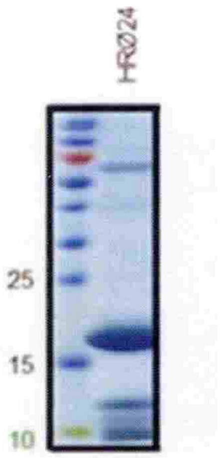
第 7A 至 7E 圖顯示接受 3 劑與 HBc VLP 或 CpG 混合或不混合的 HRØ24、HRØ、或 HRØ-3Ø 的鼻內給藥的小鼠體內的 HRØ24 特異性抗體反應。在進行 RSV 激發前 2 天，收集血清和 BALF。第 7A、7B、7C、和 7E 圖分別顯示從血清測量的 HRØ24 特異性總 IgG、IgG1、IgG2a 和 IgA 反應；以及，第 7D 圖顯示從 BALF 檢測的 HRØ24 特異性 sIgA 反應。

第 8 圖顯示血清中和效價。在進行 RSV 激發前 2 天，收集對照組或接受 4 劑鼻內給藥的接種疫苗的小鼠的血清，並測試對於 RSV 溶菌斑形成的抑制。

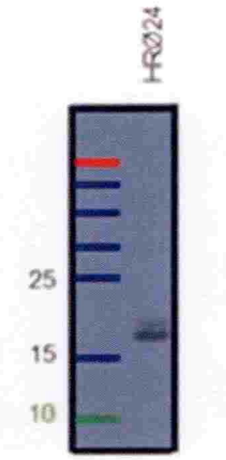
第 9 圖顯示小鼠體重在激發後的改變。在進行 RSV 激發後，監控對照組或接受 4 劑鼻內給藥的接種疫苗的小鼠的體重改變 5 天。體重改變以相對於第 0 天體重減輕的百分比表示。

(3)

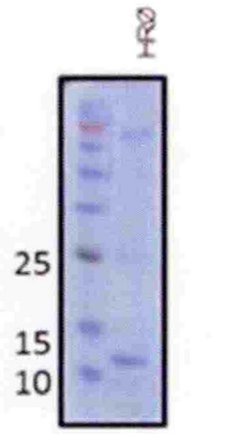
第 10 圖顯示肺組織病理學。在進行 RSV 激發 5 天後，收集對照組或接受 4 劑鼻內給藥的接種疫苗的小鼠的肺組織，進行組織學分析。



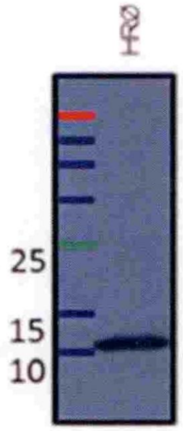
第1A圖



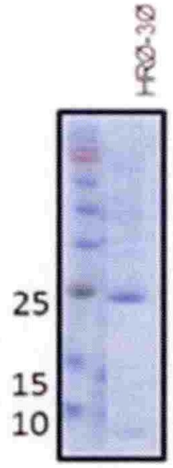
第1B圖



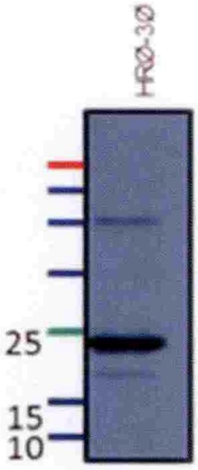
第1C圖



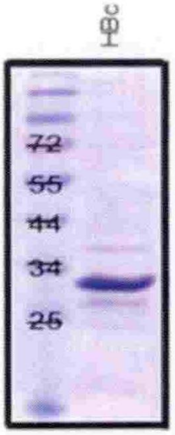
第1D圖



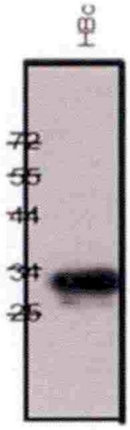
第1E圖



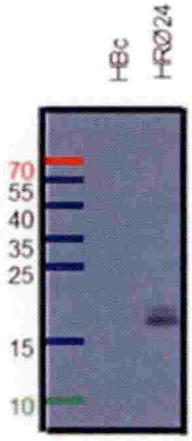
第1F圖



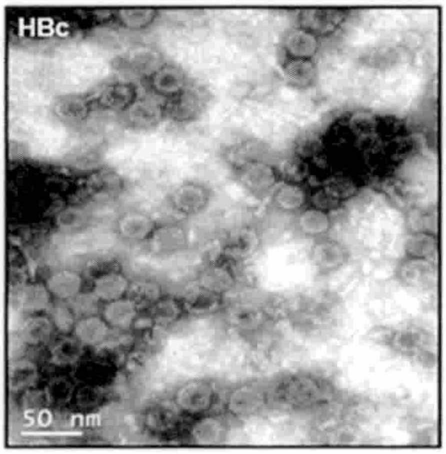
第1G圖



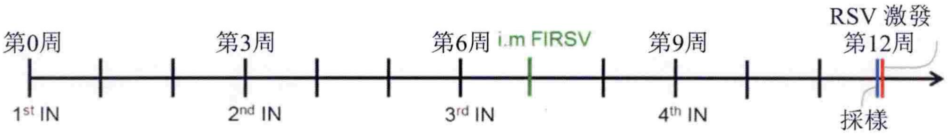
第1H圖



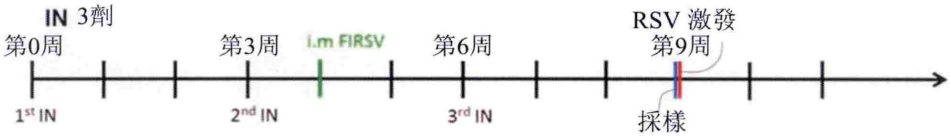
第1I圖



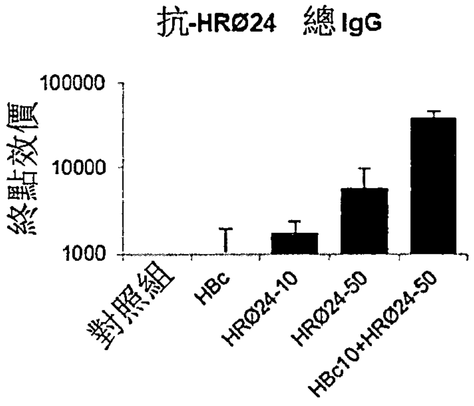
第2圖



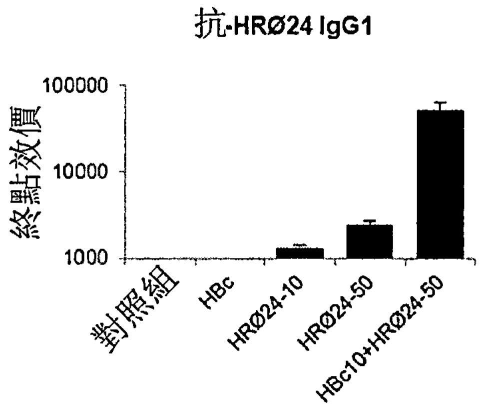
第3A圖



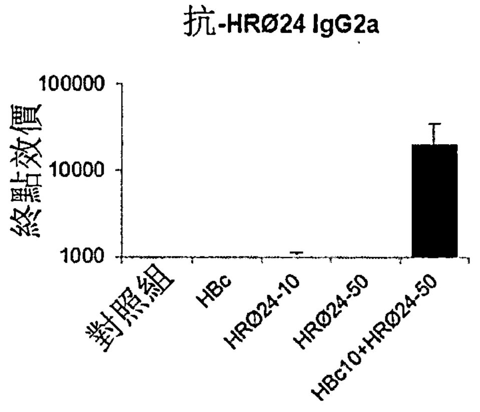
第3B圖



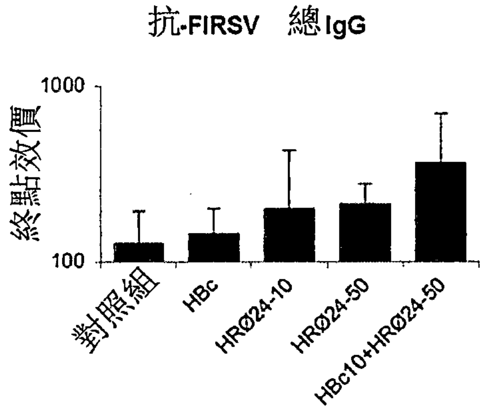
第4A圖



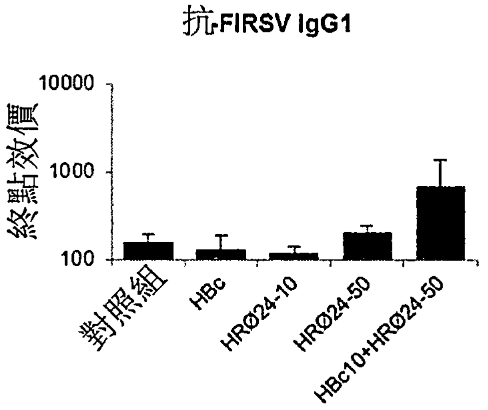
第4B圖



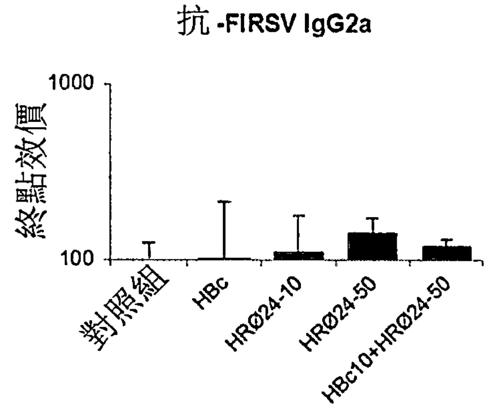
第4C圖



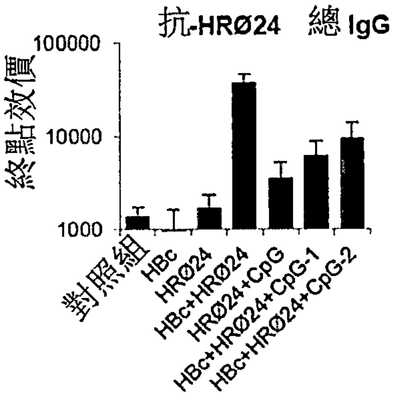
第4D圖



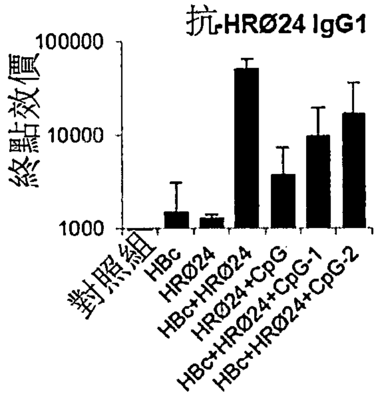
第4E圖



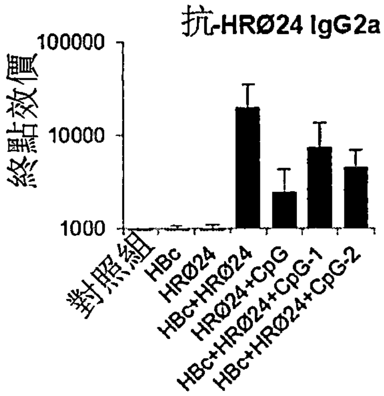
第4F圖



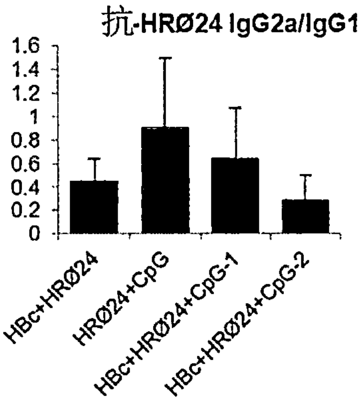
第5A圖



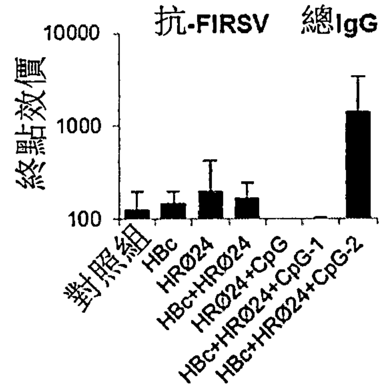
第5B圖



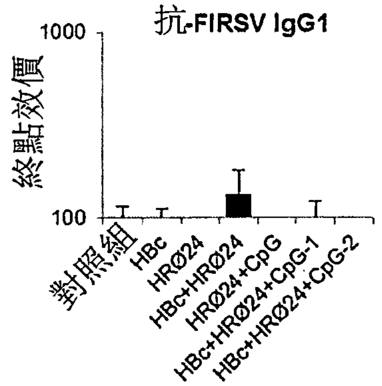
第5C圖



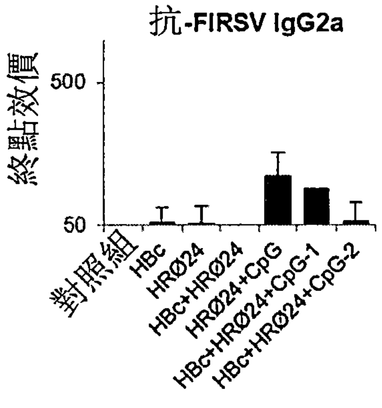
第5D圖



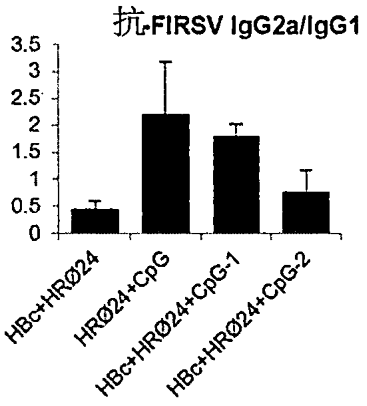
第5E圖



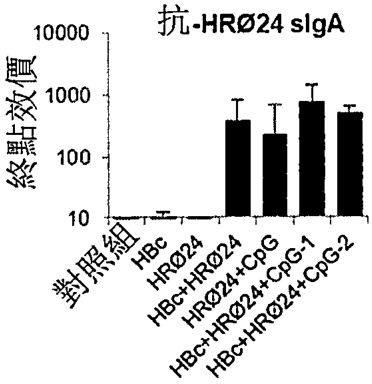
第5F圖



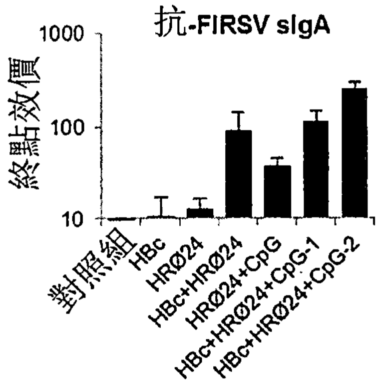
第5G圖



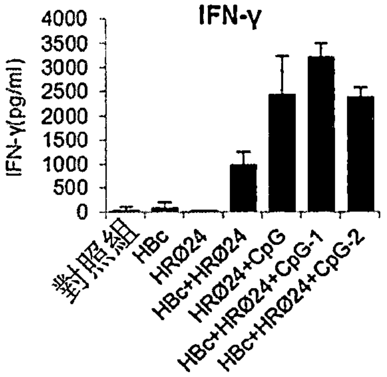
第5H圖



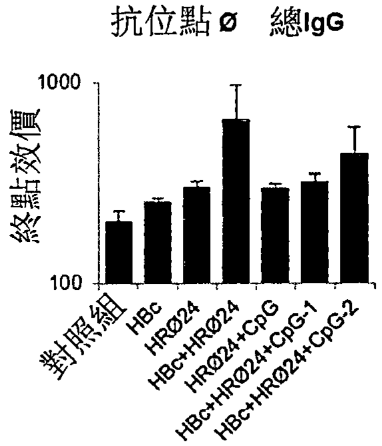
第5I圖



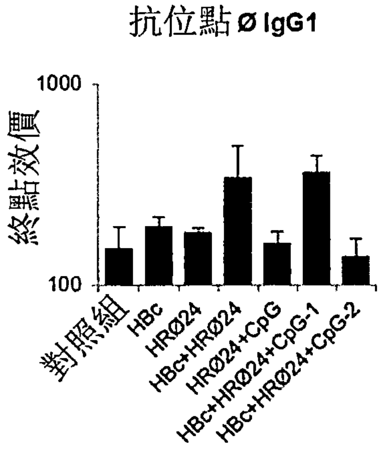
第5J圖



第5K圖

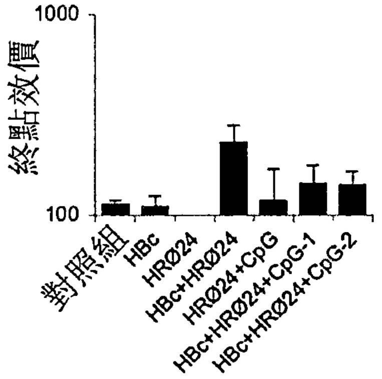


第6A圖



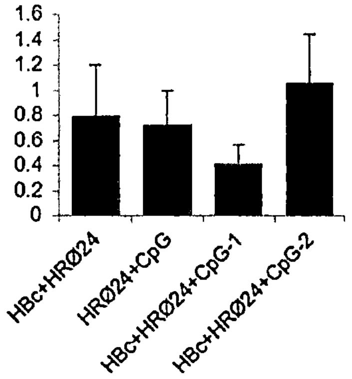
第6B圖

抗位點Ø IgG2a



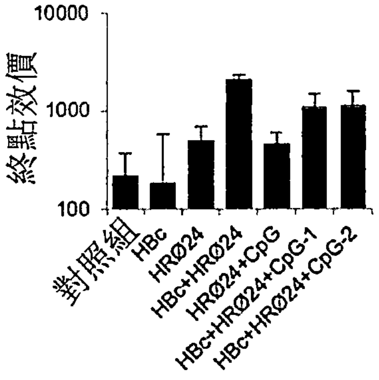
第6C圖

抗位點Ø IgG2a/IgG1

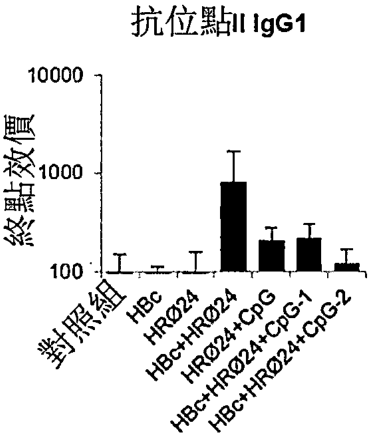


第6D圖

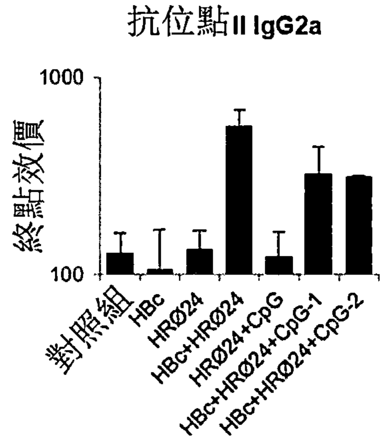
抗位點II　總 IgG



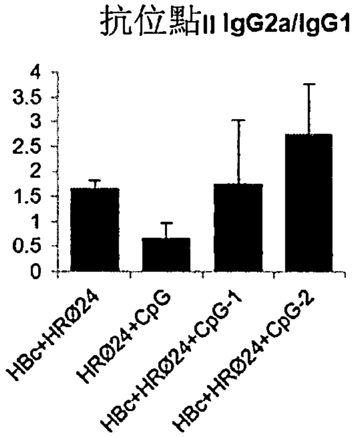
第6E圖



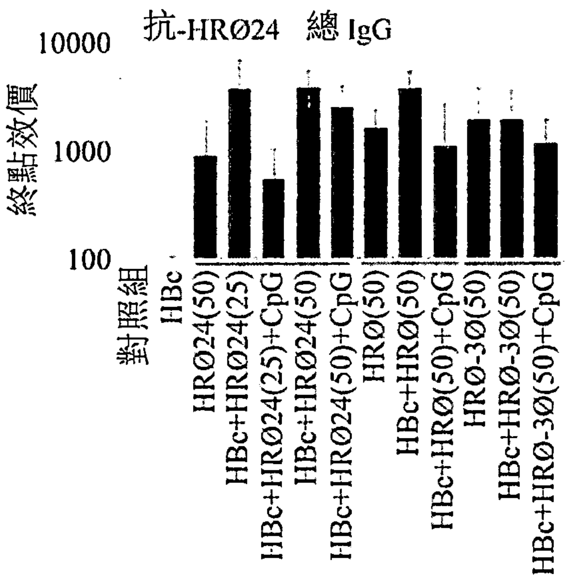
第6F圖



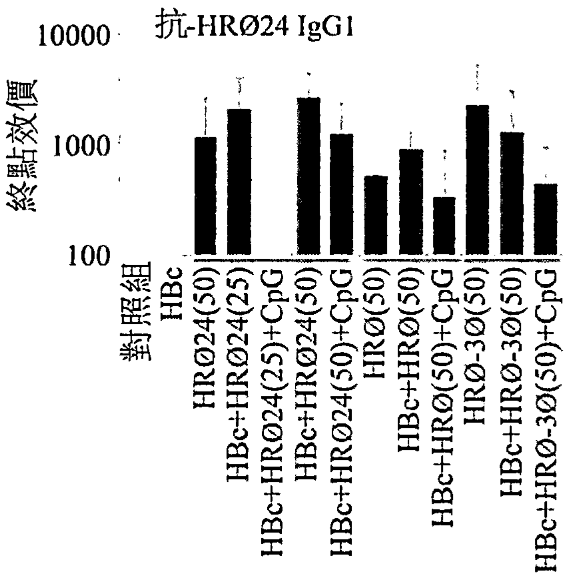
第6G圖



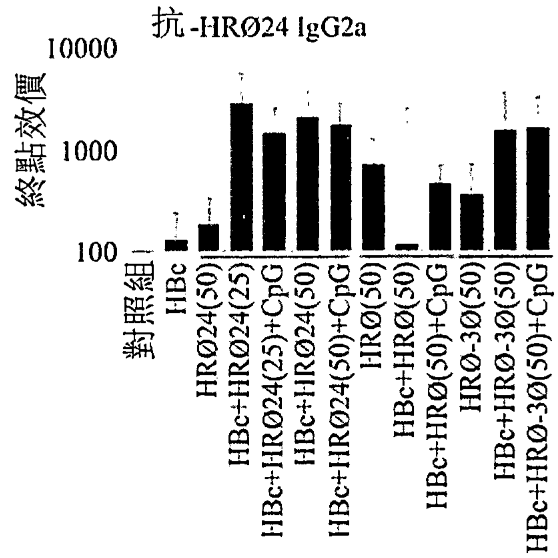
第6H圖


抗-HRØ24 總 IgG
終點效價
10000
1000
100
對照組
HBc
HRØ24(50)
HBc+HRØ24(25)
HBc+HRØ24(25)+CpG
HBc+HRØ24(50)
HBc+HRØ24(50)+CpG
HRØ(50)
HBc+HRØ(50)
HBc+HRØ(50)+CpG
HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)+CpG

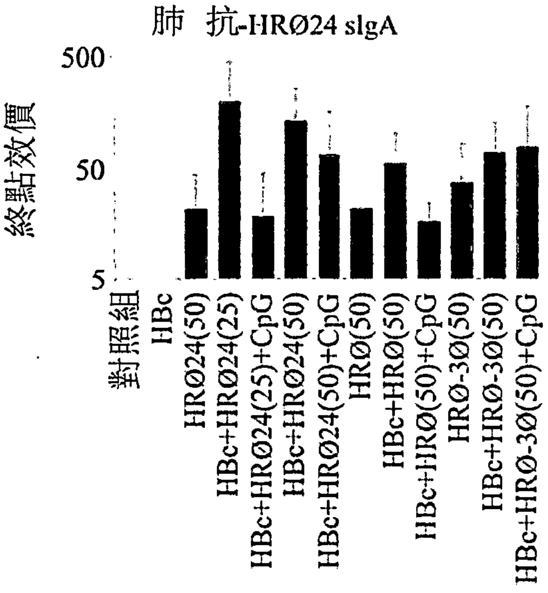
第7A圖


抗-HRØ24 IgG1
終點效價
10000
1000
100
對照組
HBc
HRØ24(50)
HBc+HRØ24(25)
HBc+HRØ24(25)+CpG
HBc+HRØ24(50)
HBc+HRØ24(50)+CpG
HRØ(50)
HBc+HRØ(50)
HBc+HRØ(50)+CpG
HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)+CpG

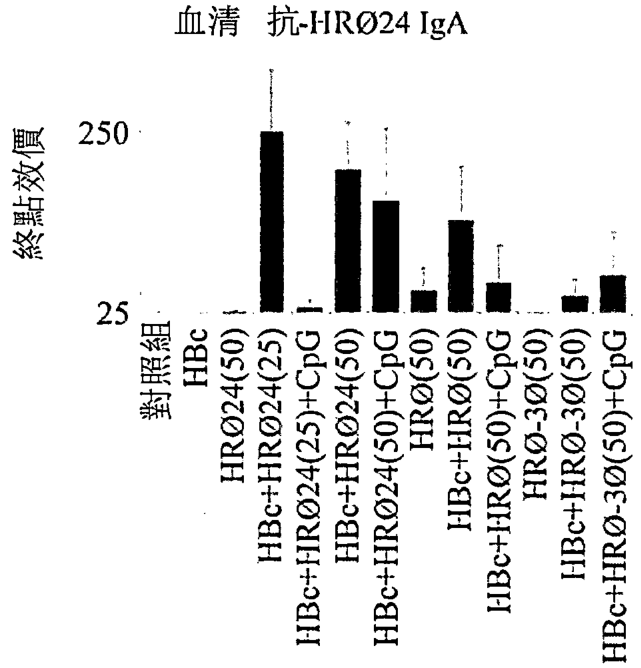
第7B圖


抗 -HRØ24 IgG2a
終點效價
10000
1000
100
對照組
HBc
HRØ24(50)
HBc+HRØ24(25)
HBc+HRØ24(25)+CpG
HBc+HRØ24(50)
HBc+HRØ24(50)+CpG
HRØ(50)
HBc+HRØ(50)
HBc+HRØ(50)+CpG
HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)+CpG

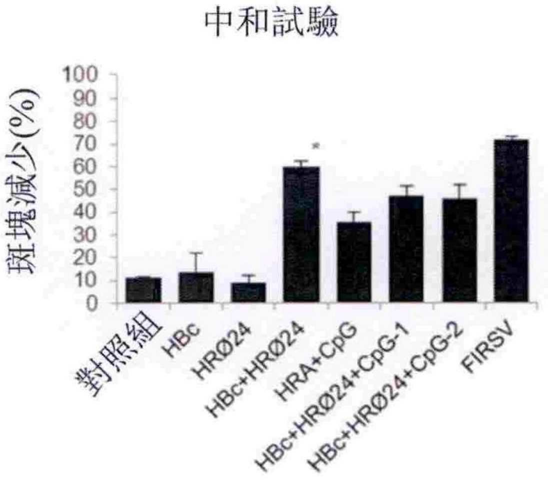
第7C圖


肺 抗-HRØ24 sIgA
終點效價
500
50
5
對照組
HBc
HRØ24(50)
HBc+HRØ24(25)
HBc+HRØ24(25)+CpG
HBc+HRØ24(50)
HBc+HRØ24(50)+CpG
HRØ(50)
HBc+HRØ(50)
HBc+HRØ(50)+CpG
HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)+CpG

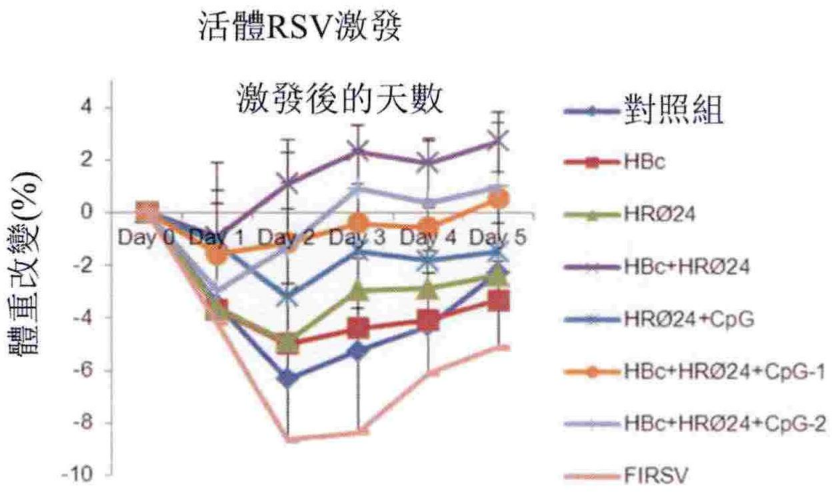
第7D圖


血清 抗-HRØ24 IgA
終點效價
250
25
對照組
HBc
HRØ24(50)
HBc+HRØ24(25)
HBc+HRØ24(25)+CpG
HBc+HRØ24(50)
HBc+HRØ24(50)+CpG
HRØ(50)
HBc+HRØ(50)
HBc+HRØ(50)+CpG
HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)
HBc+HRØ-3Ø(50)+CpG

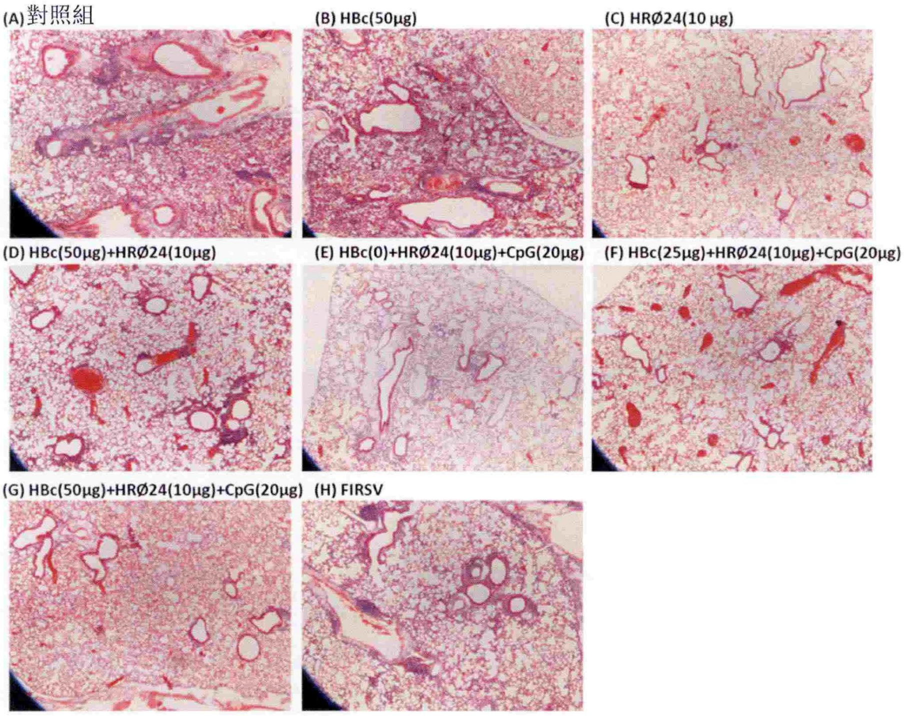
第7E圖


中和試驗
斑塊減少(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
對照組
HBc
HRØ24
HBc+HRØ24
HRA+CpG
HBc+HRØ24+CpG-1
HBc+HRØ24+CpG-2
FIRSV

第8圖


活體RSV激發
激發後的天數
體重改變(%)
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
對照組
HBc
HRØ24
HBc+HRØ24
HRØ24+CpG
HBc+HRØ24+CpG-1
HBc+HRØ24+CpG-2
FIRSV

第9圖


(A)對照組
(B) HBc(50μg)
(C) HRØ24(10 μg)
(D) HBc(50μg)+HRØ24(10μg)
(E) HBc(0)+HRØ24(10μg)+CpG(20μg)
(F) HBc(25μg)+HRØ24(10μg)+CpG(20μg)
(G) HBc(50μg)+HRØ24(10μg)+CpG(20μg)
(H) FIRSV

第10圖